



## بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی گل‌های گیاه *Humulus lupulus* L. بر عفونت موضعی استافیلوکوک در قرنيه موش کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/C

عبدالحمید نجفی

دانشیار و فوق تخصص چشم پزشکی، واحد پزشکی تهران دانشگاه آزاد اسلامی

شهرزاد خاکپور

استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی، واحد پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

مهسا هادی پور جهرمی\*

استادیار فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، واحد پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

محل انجام پژوهش: مرکز تحقیقات علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۷/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۴/۲۸

### چکیده

عفونت باکتریایی استافیلوکوک ارئوس، عفونتی فرصت طلب و شایع‌ترین علت التهاب قرنيه باکتریایی است که در صورت عدم درمان مناسب، منجر به زخم قرنيه، کاهش دقت بینایی و نهایتاً از دست‌دادن بینایی می‌شود. مجموعه گل‌های ماده گیاه رازک با نام علمی *Humulus lupulus* L. دارای خواص درمانی متعددی از جمله آنتی‌بیوتیکی علیه باکتری‌های گرم مثبت و برخی قارچ‌هاست. در تحقیق حاضر، اثرات موضعی ضد استافیلوکوک ارئوس عصاره هیدروالکلی گل‌های گیاه *Humulus lupulus* L. در مدل عفونت قرنيه توسط استافیلوکوک ارئوس در موش‌های کوچک آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. ابتدا باکتری استافیلوکوک ارئوس در چشم راست حیوانات تحت بی‌هوشی با ایجاد خراش‌هایی موازی بر سطح قرنيه تلقیح گردید. یک، سه، پنج، هفت و نه روز پس از تلقیح میکروب، چشم‌ها در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه دقیق ماکروسکوپی قرار گرفتند. در مشاهدات ماکروسکوپی، چشم‌ها از نظر شدت و وسعت کدورت، درجه‌بندی شدند. جهت بررسی اثرات آنتی‌بیوتیکی موضعی عصاره گل‌های رازک، در سه گروه مختلف مبادرت به تجویز آن در غلظت‌های یک، پنج و ده درصد به صورت قطره داخل چشمی نمودیم. درمان بلافاصله پس از بروز اولین آثار کدورت قرنيه به صورت قطره چشمی آغاز شد و روزی دو بار به مدت یک هفته ادامه یافت. اولین علائم ماکروسکوپی عفونت در قرنيه، از روز سوم پس از تلقیح آغاز می‌شود که با کدورت قابل تشخیص در مقایسه با قرنيه شفاف و سالم همراه است. این کدورت به تدریج به‌طور وابسته به زمان، پیشرفت کرد، به طوری که افزون بر نیمی از حیوانات در روز نهم پس از تلقیح، حداکثر کدورت را در قرنيه آلوده

\* مسئول مکاتبات، تهران، خیابان دکتر شریعتی، زرگنده، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران، کد پستی: ۱۹۱۶۸۹۳۱۳، تلفن: ۰۲۱۲۲۰۰۶۶۶۰

نمابر: ۰۲۱۲۲۶۰۰۷۱۴ Jahromymh@yahoo.com

داشتند. استفاده از عصاره با غلظت ۱۰ درصد به‌طور موضعی، منجر به کاهش کدورت قرنیه و کاهش شدت عفونت گردید. ایجاد مدل‌های حیوانی بیماری‌های چشمی از جمله عفونت‌های باکتریایی در قرنیه، اهمیت به‌سزایی در مطالعات چشم پزشکی دارد. مواد موثره موجود در گل‌های ماده، عمدتاً ترکیبات رزینی و اسانس است که در این میان ترکیبات رزینی دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای هستند و به‌نظر می‌رسد در بروز اثرات ضد میکروبی نقش داشته باشند.

### واژه‌های کلیدی: گیاه رازک، استافیلوکوک ارئوس، عفونت قرنیه

#### مقدمه

شفافیت آن می‌شود و عطر خاصی به آن می‌بخشد. عمده‌ترین خواص درمانی این گیاه، اثرات آرام‌بخشی، خواب‌آوری و آنتی‌بیوتیکی علیه باکتری‌های گرم مثبت و برخی قارچ‌هاست (۶،۷).

در تحقیق حاضر، اثرات موضعی ضد استافیلوکوک ارئوس عصاره هیدروالکلی گل‌های گیاه *Humulus lupulus* L. در مدل عفونت قرنیه توسط استافیلوکوک ارئوس در موش‌های کوچک آزمایشگاهی، مورد بررسی قرار گرفته است.

#### مواد و روش‌ها

##### حیوانات

موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد Balb/C با وزن ۲۵-۲۰ گرم استفاده شد. در طول دوره مطالعه، گروه‌های تجربی در خانه حیوانات با شرایط یکسان نگهداری شدند. این شرایط شامل دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته، دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و فراهم بودن آب و غذا در طول شبانه‌روز به غیر از زمان آزمون بود. از هر حیوان فقط یک نوبت آزمایش به عمل آمد. حیوانات در گروه‌های مختلف هفت‌تایی مورد آزمون قرار گرفتند و در هر دوره مورد مطالعه، از یک گروه جداگانه حیوان استفاده شده است. نگهداری و تیمار تمامی حیوانات بر اساس دستورالعمل (Use of Animals in OVR) انجام پذیرفته است که بیانگر نحوه صحیح استفاده از حیوانات در تحقیقات چشم پزشکی و بینایی است (۸).

عفونت باکتریایی استافیلوکوک ارئوس، عفونتی فرصت طلب است که اگر چه فلور طبیعی سطح پوست بدن است، اما می‌تواند عامل بروز بسیاری بیماری‌ها، از جمله کراتیت، آندوکاردیت، سپتی‌سمی، آبسه‌ها و ... باشد (۱،۲).

شایع‌ترین علت کراتیت یا التهاب باکتریایی قرنیه در بسیاری موارد از نوع استافیلوکوک ارئوس گزارش شده است (۱). این نوع عفونت چشمی، یک بیماری جدی خصوصاً در استفاده‌کنندگان از لنزهای تماسی و یا افراد با نقص سیستم ایمنی محسوب می‌گردد که در صورت عدم درمان مناسب می‌تواند باعث زخم قرنیه، کاهش دقت بینایی و نهایتاً از دست دادن بینایی شود (۳).

گیاه رازک با نام علمی *Humulus lupulus* L. از تیره شاهدانه (Cannabinaceae) گیاهی است با قدمت بیش از هزار سال که از گذشته دارای کاربردهای دارویی و نوشابه‌ای بوده و در اروپا در باغچه‌های منازل کشت می‌شده است. این گیاه در مناطق شمالی کشورمان به‌صورت خودرو نیز یافت می‌شود. قسمت مورد استفاده گیاه رازک، مجموعه گل‌های ماده آن است. در ناحیه تحتانی فلس‌های گل‌های ماده، حفرات حاوی مواد موثره وجود دارد. مواد موثره موجود در گل‌های ماده عمدتاً ترکیبات رزینی و اسانس است که در این میان، ترکیبات رزینی دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای هستند. از عصاره حاصل از گل‌های ماده رازک، در صنایع نوشابه‌سازی به صورت بسیار گسترده استفاده می‌شود (۴،۵). رازک، ویژگی‌های خاصی به ماء‌الشعیر می‌دهد که با رسوب پروتئین‌ها باعث

## تلقیح باکتری

درجه به مدت یک روز مخلوط شد و پس از استخراج، عصاره حاصل در دمای اتاق خشک گردید (عصاره ۵٪ w/w).

در تحقیق حاضر، جهت بررسی اثرات آنتی‌بیوتیکی موضعی عصاره گل‌های رازک، در سه گروه مختلف مبادرت به تجویز آن با غلظت‌های یک، پنج و ده درصد به صورت قطره داخل چشمی نمودیم. درمان بلافاصله پس از بروز اولین آثار کدورت قرنیه (روز سوم پس از تلقیح باکتری)، هر بار یک قطره، در چشم راست (که با امتیاز بالینی + مشخص گردید) به صورت قطره چشمی آغاز شد و روزی دو بار در ساعات ۷ صبح و ۷ شب، به مدت یک هفته ادامه داشت.

## نتایج

بررسی امتیازات بالینی در قرنیه چشم‌های آلوده به باکتری استافیلوکوک ارئوس (چشم راست) و شاهد (چشم چپ) پس از یک، سه، پنج، هفت و نه روز تلقیح باکتری نشان داد اولین علائم ماکروسکوپی عفونت در قرنیه که با کدورت قابل تشخیص در مقایسه با قرنیه شفاف و سالم همراه است. از روز سوم پس از تلقیح آغاز می‌شود. این کدورت به تدریج به صورت وابسته به زمان پیشرفت می‌کند، به طوری که افزون بر نیمی از حیوانات در روز نهم پس از تلقیح، حداکثر کدورت را در قرنیه آلوده داشته‌اند. تصاویری از نمونه قرنیه‌های سالم و آلوده با درجه‌بندی بالینی در قالب تصویر ۱ نشان داده شده است. مجموع امتیازات بالینی پس از سه، پنج، هفت و نه روز به ترتیب ۶، ۱۰، ۱۳ و ۱۷ برای قرنیه‌های آلوده و ۱، ۱، ۴ و ۵ برای قرنیه‌های سالم است (جدول ۱).

تیمار حیوانات با عصاره رازک به‌طور موضعی (چشمی)، از روز سوم یعنی با مشاهده اولین علائم کدورت، آغاز گردید. استفاده از غلظت‌های یک و پنج درصد در گروه‌های مختلف، تفاوت محسوسی از نظر امتیازات بالینی در میزان کدورت قرنیه ایجاد نمود، لیکن استفاده از عصاره با غلظت ۱۰ درصد، بطور موضعی، منجر

گونه باکتریایی استافیلوکوک ارئوس، از بخش میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی تهیه شد و در چشم راست حیوانات تحت بیهوشی با داروی کتامین و کلرپرومازین، با ایجاد چهار خراش موازی با سر سوزن شماره ۳۰ بدون نفوذ به عمق قرنیه و استروما تلقیح گردید (حدود  $10^8 \times 1$  باکتری با حجم  $1 \mu l$ ) (۸). این کار در شرایط آزمایشگاهی مناسب از نظر میکروبی و در زیر میکروسکوپ لوپ انجام پذیرفت. یک، سه، پنج، هفت و نه روز پس از تلقیح میکروب، چشم‌ها در زیر میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه دقیق ماکروسکوپی قرار گرفتند. جهت بررسی اثرات سر سوزن در قرنیه و ایجاد اسکار، از چشم چپ هر حیوان به‌عنوان شاهد استفاده شد که تنها با سر سوزن، خراش‌هایی دقیقاً مانند چشم راست بر سطح قرنیه وارد نمودیم. در مشاهدات ماکروسکوپی، چشم‌ها از نظر شدت و وسعت کدورت درجه‌بندی شدند. به قرنیه‌های شفاف و طبیعی (در مقایسه با چشم سالم) از نظر کلینیکی، رتبه صفر (Clinical Score: CS)، قرنیه‌های با کدورت قابل تشخیص از نظر کلینیکی، رتبه ۱+ قرنیه‌های با کدورت زیاد و پوشاندن بخشی از مردمک، رتبه ۲+ و قرنیه‌های با کدورت زیاد و پوشاندن کامل سطح مردمک، رتبه ۳+ داده شد. مجموع امتیازات بالینی نیز در هر گروه محاسبه شده است (۸).

## تهیه عصاره گل‌های گیاه

گل‌های گیاه *Humulus lupulus* L. از شمال ایران، جمع‌آوری شد و توسط بخش گیاه‌شناسی دانشگاه تهران، مورد شناسایی تاکسونومیک قرار گرفت. سپس، گل‌های گیاه، خشک گردید و با آسیاب برقی به صورت پودر در آورده شد. پودر خشک تا زمان آزمایش در فریزر نگهداری گردید. جهت تهیه عصاره گیاه از روش پرکولاسیون استفاده شد. در این روش با استفاده از دستگاه پرکولاتور با فشار زیاد، مواد موثره استخراج می‌شود. دو هزار گرم از پودر گل‌های گیاه با اتانل ۸۰

به کاهش امتیازات بالینی پس از سه، پنج، هفت و نه روز  
به ترتیب از ۶، ۱۰، ۱۳ و ۱۷ برای قرنیه‌های آلوده به ۶، ۶،  
۷ و ۸ برای قرنیه حیوانات تحت تیمار با عصاره گردید  
(جدول ۲).

جدول ۱- امتیازات بالینی قرنیه چشم‌های آلوده به باکتری استافیلوکوک ارئوس (چشم راست) و شاهد (چشم چپ) پس از سه، پنج، هفت و نه روز تلقیح باکتری.

جمع امتیاز بالینی	موش							امتیاز بالینی
	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۶	۰	+	+	+	+	+	+	چشم راست پس از سه روز
۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	+	چشم چپ پس از سه روز
۱۰	+	+	++	++	+	++	+	چشم راست پس از پنج روز
۱	+	۰	۰	۰	۰	۰	+	چشم چپ پس از پنج روز
۱۳	++	++	++	++	++	++	+	چشم راست پس از هفت روز
۴	۰	++	+	+	۰	۰	۰	چشم چپ پس از هفت روز
۱۷	++	+++	+++	+++	++	++	++	چشم راست پس از نه روز
۵	+	++	+	+	۰	۰	۰	چشم چپ پس از نه روز

قرنیه‌هایی با کدورت زیاد و پوشاندن کامل سطح مردمک. مقایسه امتیازات بالینی بین گروه‌های تجربی و شاهد در هر دوره زمانی با  $p < 0/05$  از نظر آماری، محسوس در نظر گرفته شد.

رتبه صفر قرنیه‌های شفاف و طبیعی (در مقایسه با چشم سالم) از نظر کلینیکی، رتبه ۱+ قرنیه‌های با کدورت قابل تشخیص از نظر کلینیکی، رتبه ++ قرنیه‌های با کدورت زیاد و پوشاندن بخشی از مردمک و رتبه +++

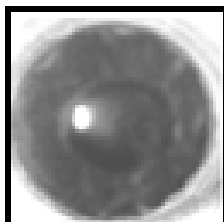
جدول ۲- امتیازات بالینی قرنیه چشم‌های آلوده به باکتری استافیلوکوک ارئوس (چشم راست) پس از شروع درمان از روز سوم با عصاره گل‌های گیاه رازک بصورت قطره چشمی، در غلظت ده درصد و گروه بدون درمان در روزهای سه، پنج، هفت و نه پس از تلقیح باکتری.

جمع امتیاز بالینی	موش							امتیاز بالینی
	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۶	۰	+	+	+	+	+	+	چشم راست پس از سه روز (بدون درمان)
۶	۰	+	+	+	+	+	+	چشم راست پس از سه روز (شروع درمان با عصاره ۱۰٪)
۱۰	+	+	++	++	+	++	+	چشم راست پس از پنج روز
۷	+	+	+	+	+	+	+	چشم راست پس از پنج روز (درمان با عصاره ۱۰٪)
۱۳	++	++	++	++	++	++	+	چشم راست پس از هفت روز
۷	+	++	+	+	+	+	۰	چشم راست پس از هفت روز (درمان با عصاره ۱۰٪)
۱۷	++	+++	+++	+++	++	++	++	چشم راست پس از نه روز
۸	+	++	+	+	+	+	+	چشم راست پس از نه روز (درمان با عصاره ۱۰٪)

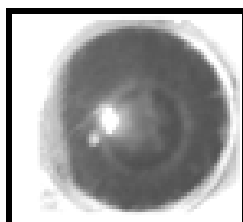
رتبه صفر قرنیه‌های شفاف و طبیعی (در مقایسه با چشم سالم) از نظر کلینیکی، رتبه ۱+ قرنیه‌های با کدورت قابل تشخیص از نظر کلینیکی، رتبه ++ قرنیه‌های با کدورت زیاد و پوشاندن بخشی از مردمک و رتبه +++ قرنیه‌های با کدورت زیاد و پوشاندن کامل سطح مردمک. مقایسه امتیازات بالینی بین گروه‌های تحت تیمار با عصاره گیاهی و شاهد (بدون درمان) در هر دوره زمانی با  $p < 0/05$  از نظر آماری، محسوس در نظر گرفته شد

تصویر ۱- تصاویر چشم‌های آلوده به استافیلوکوک ارئوس از نظر امتیاز بالینی.

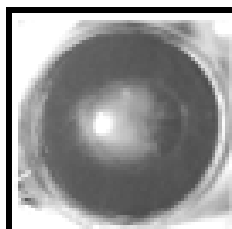
امتیاز صفر



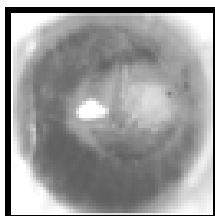
امتیاز +



امتیاز ++



امتیاز +++



رتبه صفر قرنیه‌های شفاف و طبیعی (در مقایسه با چشم سالم) از نظر کلینیکی، رتبه +۱ قرنیه‌های با کدورت قابل تشخیص از نظر کلینیکی، رتبه ++ قرنیه‌های با کدورت زیاد و پوشاندن بخشی از مردمک و رتبه +++ قرنیه‌هایی با کدورت زیاد و پوشاندن کامل سطح مردمک

## بحث

ایجاد مدل‌های حیوانی بیماری‌های چشمی، از جمله عفونت‌های باکتریایی در قرنیه، علاوه بر این که اهمیت به‌سزایی در مطالعات چشم پزشکی دارد (۹)، با دشواری‌های زیادی نیز همراه است. به‌عنوان مثال، ایجاد مدل‌های چشمی عفونت قرنیه در خرگوش در برخی مطالعات، با عدم موفقیت همراه بوده (۱۰) و دلیل آن را فعالیت زیاد آنزیم فسفولیپاز A2 عنوان کرده‌اند، زیرا این آنزیم بلافاصله در محل ورود عفونت ترشح می‌شود و کاملاً

روی باکتری‌های گرم مثبت موثر است. اخیراً مدل ایجاد زخم قرنیه در موش‌های سوری توسط سودوموناس آئروژینوزا، گزارش شده است (۱۱) و تنها در یک مطالعه، مدل عفونت و زخم قرنیه توسط استافیلوکوک ارئوس در موش‌های کوچک آزمایشگاهی موفقیت آمیز بیان گردیده است (۱۲).

در مطالعه حاضر، ابتدا مبادرت به ایجاد مدل آزمایشگاهی عفونت قرنیه توسط باکتری استافیلوکوک گردید و پس از آن، به منظور بررسی اثرات آنتی بیوتیکی

موثره موجود در گل‌های ماده عمدتاً ترکیبات رزینی و اسانس هستند که در این میان، ترکیبات رزینی اهمیت فوق‌العاده‌ای دارند. ترکیبات رزینی موجود در گل‌های ماده رازک به صورت آلفا و بتا اسیدهای تلخ هومولون و لوپولون موجود است که به‌نظر می‌رسد در بروز اثرات ضد میکروبی نقش داشته باشند (۶،۷، ۱۳).

با توجه به رویکرد جوامع پزشکی امروزی به درمان با گیاهان دارویی و مقبولیت به‌سزای گیاهان دارویی در جوامع بشری، ضروری است که مطالعات گسترده‌تری با تمرکز بر تعیین مواد موثره اصلی گیاه رازک به‌عنوان آنتی‌بیوتیک و همچنین تعیین طیف ضدباکتریایی و ضدقارچی و اثرات احتمالی آن علیه دیگر میکرو ارگانیسم‌ها انجام پذیرد.

#### تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی واحد پزشکی تهران دانشگاه آزاد اسلامی، در قالب طرح تحقیقاتی انجام شده است که بدین‌وسیله تشکر می‌گردد.

#### منابع

- 1-American Academy of ophthalmology, Basic & Clinical Science course, External Disease and Cornea, 2005; Section 8:855-60.
- 2-Gupta, S.K., Hodge, W.G. 1999. A new clinical perspective of corneal dystrophies through molecular genetics. *Curr Opin Ophthalmol* 10:234-41.
- 3-Buehler, P.O., Schein, O.D., Stamler, J.F., Verdier, D.D., Katz, J., 1992. The increased risk of ulcerative keratitis among disposable soft

موضعی عصاره گل‌های رازک، اقدام به تجویز داخل چشمی آن بصورت قطره چشمی، نمودیم. نتایج حاصله، از موفقیت آمیز بودن درمان عفونت ناشی از استافیلوکوک ارئوس به‌وسیله عصاره گل‌های ماده گیاه رازک با غلظت ۱۰ درصد دو بار در روز، پس از پنج روز و حداکثر اثر بخشی، پس از هفت روز حکایت دارد. اگرچه در مطالعات گذشته، اثرات ضد قارچ کاندیدا، ضدسل، ضد استرپتوکوک، ضد استافیلوکوک و برخی باکتری‌های گرم مثبت در شرایط *In vivo* و *In vitro* برای عصاره گیاه رازک گزارش شده است (۱۲)، لیکن تاکنون اثرات آنتی‌بیوتیکی آن به‌طور موضعی در مدل‌های عفونت چشمی مورد بررسی قرار نگرفته است.

گیاه رازک، حاوی مواد متعددی است که از آن جمله می‌توان تانن، اسید هومو تانیک، برخی فلاونوئیدها نظیر کامپفرول و ترکیبات فنلی نظیر اسید فرولیک و اسید کلروژنیک برخی اسیدهای آمینه، فیتواستروژن‌ها، مواد معدنی و املاح را نام برد. در ناحیه تحتانی فلس گل‌های ماده گیاه رازک، حفرات حاوی مواد موثره وجود دارد. مواد

contact lens users. *Arch Ophthalmol* 110:1555-8.

4-Zargari, A., 1997. Herbal medicine, Tehran university publication 3:705-20.

5-Stavri, M., Schneider R., O'Donnell, G., Lechner, D., Bucar, F., Gibbons, S. 2004. The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. *Phytotherapy research* 18(9):774-6.

6-Langezaal, C.R.A. 1993. pharmacognostical study of hop, *Humulus lupulus* L. *Pharmacy World & Science*. 15(4):178-9.

- 7-Bhattacharya, S., Virani, S., Zavro, M., Haas, G. 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* and other oral Streptococci by Hop (*Humulus lupulus* L.) constituents Economic botany 57:118-12.
- 8-Dalia, O., Sloop, D., Reed, J.M., O'Callaghan, R.J. 2003. A new topical model of Staphylococcus Corneal Infection in the mouse. Investigative Ophthalmology and Visual Science 44:1591-7.
- 9-Cowell, B.A., Wu, C., Fleiszig, S.M.J. 1999. Use of an Animal Model in Studies of Bacterial Corneal Infection. ILAR. 40(2).
- 10- Moreau, J.M., Sloop, G.D., Engel, L.S., Hill, J.M., O'Callaghan, R.J. 1997. Histopathological studies of staphylococcal alpha-toxin: effects on rabbit corneas. Curr Eye Res. 16:1221-8.
- 11- Cole, N., Willcox, M.D.P., Fleiszig, S.M.J., Stapleton, F., Bao, B., Tout, S., Husband, A. 1998. Different strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ocular infections or inflammation display distinct corneal pathologies in an animal model. Curr Eye Res. 17:730-5.
- 12- Yamaguchi, N., Satoh-Yamaguchi, K., Ono, M. 2009. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) Phytomedicine. 16(4): 369-76.
- 13- Haseleu, G., Intelmann, D., Hofmann, T., 2009. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from  $\beta$ -acids of hop (*Humulus lupulus*). Food Chemistry 116(1):71-81.





